

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-176772

(43)公開日 平成5年(1993)7月20日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C12N 15/13	ZNA			
C12P 21/02		C 8214-4B		
		8931-4B	C12N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数11(全 11 頁)

(21)出願番号	特願平4-747	(71)出願人	000003001 帝人株式会社 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号
(22)出願日	平成4年(1992)1月7日	(72)発明者	北井 一男 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人 株式会社東京研究センター内
		(74)代理人	弁理士 前田 純博

(54)【発明の名称】 新規プラスミド、微生物、抗アレルギーキメラ蛋白及びその製造方法

(57)【要約】

【目的】 本発明は、抗アレルギーキメラ蛋白を提供することを目的とする。

【構成】 (a) ヒトIgE Fc領域遺伝子及びIgG Fc領域遺伝子を連結した、抗アレルギーキメラ蛋白をコードするDNA、(b) プロモーターDNA、(c) シグナルペプチドをコードするDNA、(d) 菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与えるDNA及び(e) プロモーターDNAよりなるプラスミド、該プラスミドにより形質転換された組換え微生物細胞、該微生物細胞を培養し抗アレルギーキメラ蛋白の製造方法及び該方法により製造された抗アレルギーキメラ蛋白。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列番号1のアミノ酸配列で表わされる抗アレルギーキメラ蛋白をコードするDNA配列、(b) プロモーター機能を有するDNA配列ならびに(c) シグナルペプチドをコードするDNA配列からなる第1のDNA領域、及び(d) 菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与えるDNA配列ならびに(e) プロモーター機能を有するDNA配列からなる第2のDNA領域、を含むプラスミド。

【請求項2】 第1のDNA領域における(b) プロモーター機能を有するDNA配列が、好アルカリ性バチルス(Bacillus) No. 170株の染色体DNA由来である請求項1記載のプラスミド。

【請求項3】 (c) シグナルペプチドをコードするDNA配列が、好アルカリ性バチルス(Bacillus) No. 170株の染色体DNA由来である請求項1記載のプラスミド。

【請求項4】 (d) 菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与えるDNA配列が、プラスミドpMB9由来である請求項1記載のプラスミド。

【請求項5】 第2のDNA領域における(e) プロモーター機能を有するDNA配列が、好アルカリ性バチルス(Bacillus) No. 170株の染色体DNA由来である請求項1記載のプラスミド。

【請求項6】 プラスミドpEG2である請求項1記載のプラスミド。

【請求項7】 請求項1記載のプラスミドにより形質転換された組換え微生物細胞。

【請求項8】 微生物細胞がエシェリヒア(Escherichia) 属に属する請求項7記載の微生物細胞。

【請求項9】 微生物細胞がエシェリヒア・コリ(Escherichia coli) HB101株である請求項7記載の微生物細胞。

【請求項10】 請求項7に記載の微生物細胞を、菌体外に抗アレルギーキメラ蛋白が生成しそして蓄積するまで培養し、培養物から抗アレルギーキメラ蛋白を採取することを特徴とする抗アレルギーキメラ蛋白の製造方法。

【請求項11】 請求項10に記載の方法により製造された抗アレルギーキメラ蛋白。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は抗アレルギーキメラ蛋白をコードするDNA領域を含む新規組換えプラスミド、該プラスミドにより形質転換された新規組換え微生物細胞、該微生物を用いた抗アレルギーキメラ蛋白の菌体外分泌による製造方法及び分泌された抗アレルギーキメラ蛋白に関する。

【0002】本明細書において、アミノ酸、ポリペプチドはIUPAC-IUB生化学委員会(CBN)で採用

された方法により略記するものとし、たとえば下記の略号を用いる。

【0003】Ala L-アラニン

Arg L-アルギニン

Asn L-アスパラギン

Asp L-アスパラギン酸

Cys L-システイン

Gln L-グルタミン

Glu L-グルタミン酸

10 Gly グリシン

His L-ヒスチジン

Ile L-イソロイシン

Leu L-ロイシン

Lys L-リジン

Met L-メチオニン

Phe L-フェニルアラニン

Pro L-プロリン

Ser L-セリン

Thr L-スレオニン

20 Trp L-トリプトファン

Tyr L-チロシン

Val L-バリン

【0004】また、DNAの配列はそれを構成する各デオキシリボヌクレオチドに含まれる塩基の種類で略記するものとし、たとえば下記の略号を用いる。

A アデニン(デオキシアデニル酸を示す。)

C シトシン(デオキシシチジル酸を示す。)

G グアニン(デオキシグアニル酸を示す。)

T チミン(デオキシチミジル酸を示す。)

30 【0005】さらに、(H₂N)-及び-(COOH)はそれぞれアミノ酸配列のアミノ末端側及びカルボキシル末端側を示すものであり、(5')-及び(3')はそれぞれDNA配列の5'末端側及び3'末端側を示すものである。

【0006】

【従来の技術】すべての脊椎動物の体液中に存在し、抗原と特異的に結合する能力を有する蛋白質が抗体であり、抗体蛋白質と構造的、機能的関連をもつ蛋白質は総称して免疫グロブリンといわれている。免疫グロブリン(以下“Ig”と略することがある)は、物理化学的あるいは免疫学的な性状から、IgG、IgA、IgM、IgE、IgDの5つのクラスに分類される。

【0007】Igの基本構造は同じであり、2本のH鎖と2本のL鎖がジスルフィド結合により結ばれた形をとる。また、例えばIgにパパインなどの蛋白質分解酵素を作用させると分子中央で切断され、抗原結合活性のある断片(Fab領域蛋白質)と、抗原結合活性はなく条件により結晶化しやすい断片(Fc領域蛋白質)とに分かれる。

40 【0008】IgGでは、H鎖のカルボキシル末端側の

半分であるFc領域蛋白質は、ヒンジ、CH2、CH3の3つの部分よりなるが、IgEにおいては、CH3はIgGのCH2に、IgEのCH4はIgGのCH3に構造がそれぞれ似ているといわれている(W.C. Barkerら、J. Mol. Evol., 15, 113 (1980))。従って、例えばIgEのCH3の一部をIgGのCH2の相互に構造が似ている部分と分子を交換しても構造は大きく変化されないと考えられる。

【0009】IgEは、いわゆるI型アレルギーにおいて重要な役割を演じている。すなわち、IgEは、生体の血液中に存在する好塩基球や組織に存在する肥満細胞の細胞膜上に存在する受容体に強い親和力で結合する。次いで、ダニ抗原やスギ花粉のようなアレルギーの原因となる物質(アレルゲン)が抗原抗体反応により、先のIgEに結合し受容体間の架橋が起こると、好塩基球や肥満細胞中の顆粒に蓄えられたヒスタミン等が放出され、いわゆるアレルギー反応が惹起される。

【0010】したがって、例えばアレルゲンが結合できず且つ受容体に結合できるようなIgEを予め生体内に加えておくと、アレルゲンが存在しても架橋は起こらず、したがってアレルギー反応は惹起されないと考えられる。最近、IgE分子内の、受容体との結合に必要な領域が解明されてきた。Helmerらは、H鎖のアミノ末端から301~376番目のアミノ酸が受容体結合に必要な領域であると発表した(B. Helmerら、Nature (London), 331, 180 (1988))。この領域は、IgEのCH2とCH3にまたがる領域に相当する。

【0011】近年の遺伝子操作技術の発達により、種々の有用蛋白質を微生物により生産することが可能となった。とりわけ所望の有用蛋白質を微生物の菌体外に生産することは、①宿主菌に有害な蛋白質でも生産が可能、②精製工程の簡略化が期待できる、など産業上の利用性は極めて大きい。加えて、得た有用蛋白質の構造が天然に存在するものの構造と極めて近いという新たな長所も明らかとなった(H. Matsudaら、Mol. Immunol., 27, 57 (1990))。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明者らはアレルゲンと結合しないが受容体とは結合可能であり且つ構造が保持される可能性が大きい有用蛋白質を生産させるべく鋭意検討した結果、IgEのFc領域蛋白とIgGのFc領域蛋白を融合させた抗アレルギーキメラ蛋白を大腸菌の菌体外に分泌させることに成功し、本発明に至った。

【0013】すなわち、本発明の目的は、抗アレルギーキメラ蛋白を大腸菌等で生産するに当り、菌体外に分泌させて生産することにより、しかして抗アレルギーキメラ蛋白をコードするDNA配列を含む菌体外分泌を可能とするDNA領域及びその領域が組み込まれた新規組換えプラスミドを提供することにある。

【0014】本発明の他の目的は、上記新規組換えプラスミドによって形質転換され、目的とする抗アレルギーキメラ蛋白を、菌体外に産生し得る新規組換え微生物細胞を提供することにある。本発明の更に他の目的は、該微生物細胞を用いて抗アレルギーキメラ蛋白を菌体外分泌生産させる方法及び該方法によって製造された抗アレルギーキメラ蛋白を提供することにある。本発明の更に他の目的は、以下の説明により一層明らかになるであろう。

10 【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は、(a)配列番号1のアミノ酸配列で表わされる抗アレルギーキメラ蛋白をコードするDNA配列、(b)プロモーター機能を有するDNA配列ならびに(c)シグナルペプチドをコードするDNA配列からなる第1のDNA領域、及び(d)菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与えるDNA配列ならびに(e)プロモーター機能を有するDNA配列からなる第2のDNA領域、を含むプラスミド、そのプラスミドによって形質転換された微生物細胞、その微生物細胞を用いて抗アレルギーキメラ蛋白を菌体外分泌生産させる方法、及びその微生物細胞から分泌された抗アレルギーキメラ蛋白に関するものである。

【0016】本発明におけるプラスミドは抗アレルギーキメラ蛋白の発現を行う第1のDNA領域及び該抗アレルギーキメラ蛋白の菌体外分泌作用を行う第2のDNA領域とからなる。

【0017】抗アレルギーキメラ蛋白の発現を行う第1のDNA領域は、抗アレルギーキメラ蛋白の発現調節を行う適当な(b)プロモーター機能を有するDNA配列、適当な(c)シグナルペプチドをコードするDNA配列及び(a)配列番号1のアミノ酸配列で表わされる抗アレルギーキメラ蛋白をコードするDNA配列がこの順序に連結された形のプラスミドが最も好ましい。また適当な(c)シグナルペプチドをコードするDNA配列と(a)配列番号1のアミノ酸配列で表わされる抗腫瘍ポリペプチドをコードするDNA配列とがその読み取りフレームを一致させた形で連結されることが、とりわけ好ましい。

【0018】抗アレルギーキメラ蛋白の発現調節を行う(b)プロモーター機能を有するDNA配列を有する遺伝子としては、大腸菌β-ラクタマーゼ遺伝子、大腸菌アルカリ性ホスファターゼ遺伝子、大腸菌リポプロテイン遺伝子、枯草菌ベニシリナーゼ遺伝子、枯草菌プロテアーゼ遺伝子、酵母α因子遺伝子、好アルカリ性バチルスNo. 170株ベニシリナーゼ遺伝子、好アルカリ性エアロモナス(Aeromonas) No. 212株キシリナーゼ遺伝子、好アルカリ性バチルスNo. N-4株セルラーゼ遺伝子、好アルカリ性バチルスNo. 1139株セルラーゼ遺伝子等があげられる。これらの中で、好ましくは好アルカリ性バチルスNo. 170株ベニシリナー

ゼ遺伝子が用いられる。かかる遺伝子として、Journal of General Microbiology (1985), 131, 33 19頁に示された—134番のTから—1番のCまでの核酸を挙げることができる。

【0019】(c) シグナルペプチドをコードするDNA配列を有する遺伝子としては、大腸菌 β -ラクタマーゼ遺伝子、大腸菌アルカリ性ホスファターゼ遺伝子、大腸菌リポアロテイン遺伝子、枯草菌ベニシリナーゼ遺伝子、枯草菌プロテアーゼ遺伝子、酵母 α 因子遺伝子、好アルカリ性バチルスNo. 170株ベニシリナーゼ遺伝子、好アルカリ性エアロモナス(Aeromonas) No. 212株キシラナーゼ遺伝子、好アルカリ性バチルスNo. N-4株セルラーゼ遺伝子、好アルカリ性バチルスNo. 1139株セルラーゼ遺伝子等があげられる。これらの中で、好ましくは好アルカリ性バチルスNo. 170株ベニシリナーゼ遺伝子が用いられる。かかる遺伝子として、Journal of General Microbiology (1985) 131巻、3319頁に示された1番のAから90番のAまでの核酸を挙げることができる。

【0020】本発明において、抗アレルギーキメラ蛋白は配列番号1のアミノ酸配列で表わされる。それをコードする遺伝子の具体例として配列番号11の核酸が挙げられる。

【0021】また、配列番号1のアミノ酸において菌体外への分泌を阻害せず、なおかつ抗アレルギー活性を失活しないあるいは向上させる範囲の改変体も、本発明の中に包含されるのは言うまでもない。したがって、かかる改変体をコードするDNAも本発明を構成するものである。

【0022】さらに菌体外分泌が効率よく行なわれるためには、シグナルペプチドの領域の後ろに融合させる成熟蛋白質のアミノ末端のアミノ酸が中性又は疎水性アミノ酸であることが好ましく、該アミノ酸がSerであることが最も好ましい。

【0023】該抗アレルギーキメラ蛋白の菌体外分泌作用を行う第2のDNA領域は(d) 菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与えるDNA配列とその発現調節を行う(e) プロモーター機能を有するDNA配列とからなる。

【0024】実際的に(d) 菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与えるDNA配列としては、公知のpMB9プラスミド由来のKil遺伝子があげられるが同じ蛋白質をコードするものであればそれ以外のものも使用可能である。これらの具体例として、Journal of Bacteriology, June 1986, 731頁のFig. 4に示される1番目のAから138番目のGまでの配列が挙げられる。

【0025】実際的に(d) 菌体外分泌を促進する作用を宿主細胞に与えるDNA配列の発現調節を行う(e) プロモーター機能を有するDNA配列としては、トリプ

トファン・オペロン・プロモーター(trpプロモーター)、ラクトース・オペロン・プロモーター(lacプロモーター)、tacプロモーター、PLAプロモーター、lppプロモーター、好アルカリ性バチルスNo. 170株染色体由来のExプロモーター等があげられるが、なかでも宿主の対数増殖後期で機能する性質を有する好アルカリバチルスNo. 170株染色体DNA由来のExプロモーターがとりわけ好ましい。この具体例として、Journal of Bacteriology, June 1986, 730頁の右欄の塩基配列において1番目のGから84番目のAまでの配列が挙げられる。

【0026】これらの菌体外分泌発現型プラスミドの具体例としてはpEG2があげられる。

【0027】このプラスミドはシグナルペプチドとそうしに融合させた抗アレルギーキメラ蛋白との切り離しが分泌に際して容易に行なわれ、分泌効率の点から見てもすぐれている。

【0028】上記プラスミドを常法により適当な宿主に導入して形質転換された微生物を得る。この場合の適当な宿主としてはエシェリヒア(Escherichia) 属に属する微生物を有利に使用することができる。宿主としては、前記のエシェリヒア・コリHB101株、同C600株(ATCC23724)、同C600r-m株(ATCC33525)、同 α 1776株(ATCC31244)、同LE392株(ATCC33572)等、通常のこの種の技術分野で用いられる微生物が有利に用いられる。なかでも、エシェリヒア・コリHB101株がとりわけ好ましい。

【0029】本発明は上記の形質転換された微生物を用い、抗アレルギーキメラ蛋白を菌体外へ分泌させる方法、及びその微生物から分泌された配列番号1のアミノ酸配列で示される抗アレルギーキメラ蛋白を包含する。

【0030】以下、本発明をさらに詳細に説明する。(抗アレルギーキメラ蛋白遺伝子のクローン化) 抗アレルギーキメラ蛋白遺伝子は、化学合成したヒトIgE Fc領域遺伝子とクローン化したIgG Fc領域遺伝子(特開昭62-201582号公報第1図記載)を適当な制限酵素による切断部位を用いて連結することにより取得できる。化学合成する遺伝子の設計に際しては、用いる宿主細胞に最も適したコドンを選択することが望ましく、後にクローン化及び遺伝子改変を容易に行えるように適当な位置に適当な制限酵素による切断部位を設けることが望ましい。このような抗アレルギーキメラ蛋白遺伝子のうち化学合成した領域の塩基配列の例を配列番号2に示した。

【0031】上記のように設計したヒトIgE Fc領域遺伝子の取得は、上側の鎖、下側の鎖のそれぞれについて、たとえば図1のEF1~EF8(それぞれ配列番号3~10で表わされる)に示したような何本かのオリゴヌクレオチドに分けて、それらを化学合成し、各々の

オリゴヌクレオチドを連結する方法をとるのが望ましい。

【0032】各オリゴヌクレオチドの合成法としてはジエステル法 [H.G.Khorana, "Some Recent Developments in Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest", John Wiley and Sons, Inc., New York (1961)]、トリエステル法 [R.L.Letsinger ら、J. A. M. Chem. Soc., 89, 4801 (1967)] 及びホスファイト法 [M.D. Matteucci ら、Tetrahedron Lett., 21, 719 (1980)] があるが、合成時間、収率、操作の簡便さ等の点から、全自動DNA合成機を用いたホスファイト法による合成が好ましい。

【0033】合成したオリゴヌクレオチドの精製は、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、逆相カラムによる高速液体クロマトグラフィー等を、適宜単独もしくは組合せて用いることができる。

【0034】こうして得られた合成オリゴヌクレオチドの5'末端側の水酸基は、たとえばT4-ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化した後、アニーリングさせ、たとえばT4-DNAリガーゼを用いて連結する。

【0035】このようにして得られたDNA断片を、適当なプロモーター領域・シグナルペプチド領域・IgGFc領域及び、抗アルカリ性バチルスNo. 170株由来のExプロモーター領域とpMB9プラスミド由来のKil遺伝子からなる菌体外分泌生産に関与する情報を担うDNA領域を合わせ持つようなプラスミドに直接挿入すれば、上記のプラスミドが、より簡便に得られる。

【0036】このようなプロモーター領域・シグナルペプチド領域を有する遺伝子としては、大腸菌β-ラクタマーゼ遺伝子、大腸菌アルカリ性ホスファターゼ遺伝子、大腸菌リボプロテイン遺伝子、枯草菌ベニシリナーゼ遺伝子、枯草菌プロチナーゼ遺伝子、酵母α因子遺伝子、好アルカリ性バチルスNo. 170株ベニシリナーゼ遺伝子、好アルカリ性エアロモナス (Aeromonas) No. 212株キシラナーゼ遺伝子、好アルカリ性バチルスNo. N-4セルラーゼ遺伝子、好アルカリ性バチルスNo. 1139株セルラーゼ遺伝子等があげられるが、好ましくは好アルカリ性バチルスNo. 170株ベニシリナーゼ遺伝子が用いられる (Journal of general Microbiology (1985), 131, 3317頁記載)。

【0037】前記の各遺伝子内のプロモーター領域は、各々独立して他の遺伝子のシグナルペプチド領域と組合せることもできる。

【0038】適当なプロモーター領域、適当なシグナルペプチド領域及び抗アレルギーキメラ蛋白をコードするDNA領域が、この順序に連結された形のプラスミドが最も好ましく、適当なシグナルペプチド領域と抗アレルギーキメラ蛋白をコードするDNA領域とがその読み取

りフレームを一致させた形で連結されることが、とりわけ好ましい。

【0039】このような菌体外分泌発現型プラスミドとして、好ましくはpEG2が用いられる。

【0040】なお、本発明において適当なプロモーター領域、シグナルペプチド領域、抗アレルギーキメラ蛋白をコードするDNA領域、Exプロモーター領域及びKil遺伝子は、これらと生物学的機能において同等なDNA領域、すなわち該DNA領域に対してヌクレオチドの置換、ヌクレオチドの欠失、ヌクレオチドの挿入及びヌクレオチド配列の逆位その他の突然変位によって関連づけられているDNA領域でもよいことはいうまでもない。

【0041】(抗アレルギーキメラ蛋白の生産) かくして得られた、抗アレルギーキメラ蛋白遺伝子菌体外分泌発現型プラスミドを常法により適当な宿主に導入して組換え微生物を得、これを培養することにより、抗アレルギーキメラ蛋白を生産させることができる。

【0042】このような宿主としてはエシェリヒア (Escherichia) 属に属する微生物を有利に使用することができる。宿主としては、前記のエシェリヒア・コリHB101株、同C600株 (ATCC23724)、同C600r-m-株 (ATCC33525)、同x1776株 (ATCC31244)、同LE392株 (ATCC33572) 等、通常のこの種の技術分野で用いられる微生物が有利に用いられる。なかでも、エシェリヒア・コリHB101株がとりわけ好ましい。

【0043】このようにして得られた組換え微生物を、それ自体は公知の方法で培養する。培地としては、抗アレルギーキメラ蛋白の生産に適した培地であって、かつ宿主微生物の生育に適した培地を用い得るが、たとえばM9培地 [T. Maniatis ら編、Molecular Cloning P440 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1982)]、LB培地 [T. Maniatis ら編、Molecular Cloning P440 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1982)]、BPB培地 (Difco製)、Nutrient 寒天培地等を基本培地として調製したものをいれればよい。

【0044】その他、必要に応じて、炭素源、酸素源の他にアミノ酸、ビタミン等の栄養素を添加してもよいし、発現型プラスミドの宿主内安定かのために適当量の抗生物質等を添加してもよい。

【0045】培養は、pH、温度、酸素供給量を目的の組換え微生物に適した条件で行なう。菌体外分泌発現型プラスミドを有する組換え微生物の培養においては、該微生物が生育してその菌体量が最大に達したとき、すなわち対数増殖後期から培地中に抗アレルギーキメラ蛋白が生成、蓄積するまでの時間中、同一培地で培養をそのまま継続するのがよい。

【0046】たとえばエシェリヒア属の微生物の前記菌

体量が最大に達したときから培地中に抗アレルギーキメラ蛋白の生成、蓄積が停止するまでの時間は、ほぼ12～48時間の範囲である。なおpH条件は特に影響されないが、pH5～8の範囲、特にpH7.2が適当である。

【0047】(抗アレルギーキメラ蛋白の活性評価) 菌体外分泌発現型プラスミドを有する組換え微生物を培養した後、たとえば遠心分離により微生物を除去する。得られた抗アレルギーキメラ蛋白を含有する培養上清について、直接あるいは常法による濃縮操作によって濃縮した後、活性の評価を行なう。

【0048】(抗アレルギーキメラ蛋白の分離・精製) 菌体外分泌発現型プラスミドを有する組換え微生物培養上清からの抗アレルギーキメラ蛋白の分離・精製は、公知の通常知られている蛋白質の分離・精製法に従えばよいが、プロテインAを用いたアフィニティー・カラム・クロマトグラフィーが有利である。

【0049】こうして得られた抗アレルギーキメラ蛋白精製品について、SDS-ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動[U.K.Laemmli, Nature, 227, 680(1970)]による分子量解析、アミノ末端のアミノ酸配列解析及びアミノ酸組成分析を行なうことにより、シグナルペプチドが正しく切断された抗アレルギーキメラ蛋白の分泌が確認できる。

【0050】

【発明の効果】本発明の菌体外分泌発現型プラスミドによって本発明の対象とする抗アレルギーキメラ蛋白の菌体外への分泌が可能となった。このポリペプチドは菌体内へ蓄積することによって悪影響を受けることの少ないポリペプチドでその抗アレルギー活性の応用が期待される。

【0051】

【実施例】以下、実施例を掲げて本発明について詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0052】

【実施例1】

(ヒトIgE Fc領域遺伝子の設計) 配列番号2に示した塩基配列のヒトIgE Fc領域の遺伝子を設計した。設計に際しては、ヒトIgE Fc領域のアミノ末端側に、アミノ酸Serと制限酵素Hind IIIによる切断部位を含むようにし、シグナルペプチドとの連結を容易にした。また、カルボキシ末端側に、IgG Fc領域の必要な領域の一部と制限酵素Sst IIによる切断部位を含みIgG Fc領域との連結を容易にした。

【0053】

【実施例2】

(オリゴヌクレオチドの化学合成) 実施例1で設計したヒトIgE Fc領域遺伝子は、図1に示したように配列番号3～10で示される8本のオリゴヌクレオチドE

F1～EF8に分けて合成する。この場合、オリゴヌクレオチドEF1は配列番号3、EF2は配列番号4、EF3は配列番号5、EF4は配列番号6、EF5は配列番号7、EF6は配列番号8、EF7は配列番号9、EF8は配列番号10に対応する。

【0054】オリゴヌクレオチドの合成は全自動DNA合成機(アプライド・バイオシステムズ、モデル380A)を用いて、ホスファイト法により行なった。

【0055】合成オリゴヌクレオチドの精製は、アプライド・バイオシステムズ社のマニュアルに準じて行なった。すなわち、合成オリゴヌクレオチドを含むアンモニア水溶液を55℃で一晩保つことにより、DNA塩基の保護基をはずし、セファデックスG-50ファイン・ゲル(ファルマシア)を用いたゲル濾過によって、高分子量の合成オリゴヌクレオチド画分を分取する。

【0056】ついで、7M尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃度20%)の後、紫外線シャドウイング法により泳動パターンを観察を行なう。目的とする大きさのバンド部分を切出して、そのポリアクリルアミドゲル断片を細かく破砕した後、2～5mlの溶出用バッファー[500mM NH₄OAc-1mM EDTA-0.1%SDS(pH7.5)]を加え、37℃で一晩振盪した。

【0057】遠心分離し、目的のDNAを含む溶液をゲル濾過カラム(セファデックスG-50)にかけることにより、合成オリゴヌクレオチドの精製品を得た。なお、必要に応じて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を繰返し、合成オリゴヌクレオチドの純度の向上をはかった。

【0058】

【実施例3】

(化学合成ヒトIgE Fc領域遺伝子のクローン化) 実施例2で作成した8本の合成オリゴヌクレオチド(EF1～EF8)を用いて、クローン化した。

【0059】0.1～1.0μgの合成オリゴヌクレオチドEF2～EF7の5'末端側を、5～15ユニットのT4-ポリヌクレオチドキナーゼ(E.Coli Bタイプ、宝酒造)を用いて、それぞれ別々にリン酸化する。リン酸化反応は10～20μlの50mM Tris-HCl(pH9.5), 10mM MgCl₂, 5mM ジチオスレイトール, 10mM ATP水溶液中で、37℃で、30分間行なった。

【0060】反応終了後、すべての合成オリゴヌクレオチド水溶液をすべて混合し、フェノール抽出、エーテル抽出によりT4-ポリヌクレオチドキナーゼを失活、除去する。この合成オリゴヌクレオチド混合液に、新たに0.1～1.0μgの合成オリゴヌクレオチドEF1及びEF8を加え、90℃で5分間加熱した後室温まで徐冷して、アニーリングを行なう。次に、これを減圧乾固した後、30μlの66mM Tris-HCl(pH

11

7.6)、6.6mM $MgCl_2$ 、10mMジチオスレイトール、1mM ATP水溶液に溶解させ、300ユニットのT4-DNAリガーゼ(宝酒造)を加えて、11℃で15時間連結反応を行なった。反応終了後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル濃度5%)を行ない、エチジウムブロマイド染色法により泳動パターンの観察を行なう。目的とする大きさ(約270bp)のバンド部分を切出して、実施例2の方法に従ってポリアクリルアミドゲルよりDNAを回収する。

【0061】一方、3μgのIgG Fc領域・菌体外分泌発現型プラスミドpEXFC10(約4.4Kbp)(特開昭62-201582号記載)を30μlの10mM Tris-HCl(pH7.5)、60mM $NaCl_2$ 水溶液に溶解させ、10ユニットの制限酵素Hind III(宝酒造)を添加して、37℃で1時間切断反応を行なった。

【0062】制限酵素Hind IIIによる切断の後、フェノール抽出、エーテル抽出を行ない、エタノール沈澱によりDNAを回収する。このDNAを30μlの10mM Tris-HCl(pH7.4)、10mM $MgSO_4$ 、1mMジチオスレイトール水溶液に溶解させ、10ユニットの制限酵素Sst II(ベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ)を添加して、37℃で1時間切断反応を行なった。

【0063】反応終了後、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度0.8%)を行ない、エチジウムブロマイド染色法により切断パターンの観察を行なう。

【0064】プラスミドpEXFC10の大部分を含む約5.4KbpのDNAの部分に相当するバンドを切出し、そのアガロースゲル断片を3倍量(vol/wt)の8M $NaClO_4$ 水溶液に溶解させた。Chenらのガラスフィルター法[C.W.Chenら、Anal. Biochem. 101, 339(1980)により、約5.4KbpのDNA断片(Hind III→Sst II)をアガロースゲルより回収した。

【0065】先に得られたIgE Fc領域遺伝子を含む約270bpのDNA断片について、前記の方法に準じて末端のリン酸化反応を行なった後、プラスミドpEXFC10の大部分を含む約5.4KbpのDNA水溶液と混合する。エタノール沈澱の後、前記の方法に準じて両DNA断片の連結反応を行なった。

【0066】エシェリヒア・コリHB101株の形質転換は、通常の $CaCl_2$ 法(M.V.Norgardらの方法)の改良法で行なった。

【0067】すなわち、5mlのL培地(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、pH7.2)にエシェリヒア・コリHB101株の18時間培養基を接種し、菌体を含む培養液の600nmにおける濁度(OD_{600})が0.3に達するまで生育させる。菌体を冷たいマグネシウム・バッファー[0.1M NaC 50

12

1、5mM $MgCl_2$ 、5mM Tris-HCl(pH7.6、0℃)]中で2回洗い、2mlの冷やしたカルシウム・バッファー[100mM $CaCl_2$ 、250mM KCl、5mM $MgCl_2$ 、5mM Tris-HCl(pH7.6、0℃)]中に再懸濁させ、0℃で25分間放置する。次に菌体をこの容量の1/10にカルシウム・バッファーの中で濃縮し、連結後のDNA水溶液と2:1(vol.:vol.)混合する。

【0068】この混合物を60分間、0℃で保った後、1mlのLBG培地(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、0.08%グルコース、pH7.2)を添加し、38℃で1時間振盪培養する。培養液を、選択培地[クロラムフェニコール(ペーリンガー)20μg/mlを含むL培地プレート]に100μl/プレートの割合で接種する。

【0069】得られたクロラムフェニコール耐性のコロニーより、公知の方法を用いてDNAを調製し、アガロースゲル電気泳動により、目的のプラスミドpEG2(約5.7Kbp)の取得を確認した。図1に、抗アレルギーキメラ蛋白分泌発現プラスミドpEG2の作成方法を示す。

【0070】こうして得られたプラスミド、pEG2の、合成オリゴヌクレオチド使用部分の塩基配列が設計通りであることは、マキサム・ギルバート法(A.M.Maxamら、Methods Enzymol., 65, 499(1980))によって確認した。

【0071】

【実施例4】

(菌体外分泌発現型プラスミドpEG2を有する組換え微生物の培養) 抗アレルギーキメラ蛋白遺伝子を有しない分泌プラスミドベクターpEAP8を有するエシェリヒア・コリHB101株(FERM BP-1909)及び実施例3で得られた抗アレルギーキメラ蛋白遺伝子菌体外分泌発現型プラスミドpEG2を有するエシェリヒア・コリHB101株を、それぞれLBG培地[1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、0.1%グルコース(pH7.2)]に接種し、37℃で24時間振盪培養を行なう。

【0072】培養終了後、遠心分離によって菌体を分離し、得られた培養上清を評価用試料とした。

【0073】

【実施例5】

(pEG2にコードされるアレルギーキメラ蛋白の検出) 前記実施例4で得られたpEAP8を有するエシェリヒア・コリHB101株及びpEG2を有するエシェリヒア・コリHB101株からの培養上清300μl分に相当する培養上清濃縮物に対して、Tris-HClバッファー(pH6.8)とSDSと2-メルカプトエタノールとグリセロールとを、それぞれ最終濃度60mM、2%、4%、10%になるように加え、SDS-ポ

13

リアクリルアミドゲル電気泳動〔鈴木、遺伝、31、43(1977)〕を行なった。

【0074】分離用ゲルは15%とし、泳動バッファーはSDS-Tris・グリシン系〔U.K. Laemmli, Nature, 227, 680(1970)〕を用いた。

【0075】電気泳動終了後、ゲル蛋白質を、25mM Tris-192mMグリシン(pH8.3)-20%メタノールのバッファー中で、電気泳動的にニトロセルロース・フィルターに吸着させ、ウエスタン・ブロッティングを行なった。

【0076】蛋白質を吸着させたニトロセルロース・フィルターを5%ウシ血清アルブミンを含むPBSバッファー中に60分間浸した後、一次抗体としてウサギ抗ヒトIgG抗体を含む抗血清(カッペル)およびヤギ抗ヒトIgE抗体を含む抗血清(カッペル)を用いた間接法で、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いたイミュン・ブロット・アッセイ・キット(バイオ・ラッド)により、培養上清中の抗アレルギーキメラ蛋白を特異的に染色し *

配列

Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr
1 5 10 15
Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser
20 25 30
Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp
35 40 45
Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu Val Val Asp Leu
50 55 60
Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser Val Asp Gly Val
65 70 75 80
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
85 90 95
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
100 105 110
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
115 120 125
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
130 135 140
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
145 150 155 160
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
165 170 175
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
180 185 190
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
195 200 205
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
210 215 220
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
225 230 235 240
Leu Ser Pro Gly Lys

14

*た。そうしたところ、pEG2を有する大腸菌の培養上清中に、抗アレルギーキメラ蛋白に由来するバンドが検出された。

【0077】以上の結果より、好アルカリ菌ペニシリナーゼ遺伝子シグナル領域の下流に、アミノ末端にセリンを有する抗アレルギーキメラ蛋白遺伝子を融合させることにより、抗アレルギーキメラ蛋白の菌体外分泌が達成されることがわかる。

【0078】

10 【配列番号】

【0079】配列番号：1

配列の長さ：245

配列の型：アミノ酸

鎖の数：

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列の特徴：

【0080】配列番号: 2

配列の長さ: 272

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

* トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の特徴:

*

配列

AGCT AGC CAG AAA CAC TGG CTG TCC GAC CGC ACC TAC ACC TGC CAG GTT ACC 52
 Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr
 1 5 10 15
 TAC CAG GGT CAC ACC TTC GAA GAC AGC ACC AAA AAA TGC GCT GAT TCC 100
 Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser
 20 25 30
 AAC CCG CGT GGT GTT AGC GCT TAC CTG AGC CGT CCG AGC CCG TTC GAC 148
 Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp
 35 40 45
 CTG TTC ATC CGC AAA TCC CCG ACT ATC ACC TGC CTG GTT GTT GAC CTG 196
 Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu Val Val Asp Leu
 50 55 60
 GCA CCG AGC AAA GGT ACC GTT AAC CTG ACC TGG TCC GTG GAC GGC GTG 244
 Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser Val Asp Gly Val
 65 70 75 80
 GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG C 272
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 85 89

【0081】配列番号: 3

配列の長さ: 57

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

※ トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の特徴:

※

配列

AGCTAGCCAG AAACACTGGC TGTCGACCG CACCTACACC TGCCAGGTTA CCTACCA 57

【0082】配列番号: 4

配列の長さ: 61

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

★ トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の特徴:

★

配列

TGTGACCCTG GTAGGTAACC TGGCAGGTGT AGGTGCGGTC GGACAGCCAG TGTTCCTGGC 60
 T 61

【0083】配列番号: 5

配列の長さ: 66

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

☆ トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

40 配列の特徴:

☆

配列

GGGTACACC TTCGAAGACA GCACCAAAAA ATGGGCTGAT TCCAACCGC GTGGTGTTAG 60
 CGCTTA 66

【0084】配列番号: 6

配列の長さ: 66

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

◆ トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の特徴:

◆

配列

GGCTCAGGTA AGCGCTAACA CCACGCGGGT TGAATCAGC GCATTTTTTG GTGCTGTCTT 60

17		18
CGAAGG		66
【0085】配列番号：7	*トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：61	配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸	配列の特徴：	
鎖の数：一本鎖	*	
配列		
CCTGAGCCGT CCGAGCCCGT TCGACCTGTT CATCCGCAAA TCCCCGACTA TCACCTGCCT		60
G		61
【0086】配列番号：8	※トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：61	10 配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸	配列の特徴：	
鎖の数：一本鎖	※	
配列		
TCAACAACCA GGCAGGTGAT AGTCGGGGAT TTGGGGATGA ACAGGTCGAA CGGGCTCGGA		60
C		61
【0087】配列番号：9	★トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：88	配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸	配列の特徴：	
鎖の数：一本鎖	★	
配列		
GTTGTTGACC TGGCACCAG CAAAGGTACC GTTAACCTGA CCTGGTCOGT GGACGGCGTG		60
GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGC		88
【0088】配列番号：10	☆トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：78	配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸	配列の特徴：	
鎖の数：一本鎖	☆	
配列		
GGCTTTGTCT TGGCATTATG CACCTCCAG CCGTCCACGG ACCAGGTGAG GTTAACGGTA		60
CCTTTGCTCG GTGCCAGG		78
【0089】配列番号：11	30◆トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：735	配列の種類：DNA	
配列の型：核酸	配列の特徴：	
鎖の数：	◆	
配列		
AGCCAGAAAC ACTGGCTGTC CGACCGCACC TACACCTGCC AGGTTACCTA CCAGGGTCAC		60
ACCTTCGAAG ACAGACCAA AAAATGCGCT GATTCCAACC CGGTGGTGT TAGCGCTTAC		120
CTGAGCGTC CGAGCCGTT CGACCTGTTT ATCGCAAAT CCCCAGTAT CACCTGCCTG		180
GTTGTTGACC TGGCACCAG CAAAGGTACC GTTAACCTGA CCTGGTCOGT GGACGGCGTG		240
GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGGG GAGGAGCAGT ACAACAGCAC GTACGGGTG		300
GTCAGCGTCC TCAACGTCCT GCACCAGGAC TGGCTGAATG GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG		360
GTCTCCAACA AAGCCCTCCC AGCCCCATC GAGAAACCA TCTCAAAGC CAAAGGGCAG		420
CCCCGAGAAC CACAGGTGTA CACCCTGCCC CCATCCGGG AGGAGATGAC CAAGAACCAG		480
GTCAGCTGA CTGCCTGGT CAAAGGCTT TATCCAGCG ACATCGCGT GGAGTGGGAG		540
AGCAATGGG AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCGTGCTGGA CTCCAGCGC		600
TCCTTCTCC TCTATAGCAA GCTCACCCTG GACAAGAGCA GGTGGCAGCA GGGGAACGTC		660
TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC		720
CTGTCCCCGG GTAAA		735

【図面の簡単な説明】

* ラスミドPEG2の作製方法を示した図である。

【図1】抗アレルギーキメラ蛋白遺伝子菌体外発現型*

【図1】

